

F2

German Democratic Republic  
(19) DD (11) 248 433 A1  
(12) Commercial Patent

Patent Specification

Granted according to Section. 17 paragraph 1 Patent Law

4(51) G 01 N 21/64  
G 01 N 33/483

Office for Inventions and Patents

Published in the version submitted by the applicant

(21) WP G 01 N / 269 567 2      (22) 16 November 1984      (44) 05 August 1987  
(71) Humboldt University at Berlin, Directorate for Research, 1080 Berlin, Unter den Linden 6, DD  
(72) Koepp, Reinhold, Dr. rer.nat. Dipl.-Phys.; Senoner, Mathias, Dr. rer.nat. Dipl.-Phys.; Kutscher,  
Joachim, Dipl.-Phys.; Schoenborn, Hans-Juergen, Dr. rer.nat. Dipl.- Biophys.; Voigt, Joachim, Doz. Dr.  
sc.nat. Dipl.-Phys.; Matschke, Juergen, Dr. sc. Dipl.-Landw.-Phys., DD

(54) Optical procedure for proof of damage of the photosynthesis apparatus

(57) The invention concerns a procedure for proof of damage of the photosynthesis apparatus and can especially be used for the assessment of the effect of biological, chemical, and physical stress factors. The procedure according to the invention can be applied in land and forest management and in horticulture as well as in environmental protection. The task of the invention is the development of a procedure for the proof of damage of the photosynthesis apparatus by exploiting delayed chlorophyll fluorescence. According to the invention, the task is solved in that the induction curve of delayed chlorophyll fluorescence is utilized to show proof of damage to the photosynthesis apparatus. The induction curves of damaged plants are thereby compared with those of undamaged plants.

ISSN 0433-6461

4 Pages

-1- 248 433

Patent Claims

1. Optical procedure for the proof of damage of the photosynthesis apparatus through measurement of delayed chlorophyll fluorescence, recognizable in that the intensity of the delayed chlorophyll fluorescence is measured as a function of time from the beginning of an illumination after a dark phase in a plant to be investigated, and this curve is compared with the curve for an undamaged plant and the difference is taken as a measurement of the damage.
2. Procedure according to claim 1, recognizable in that the following curve characteristics are used for comparison: height of the maximum, relationship of the height of the maximum to the height of the stationary level, and the time position of the maximum.
3. Procedure according to claim 1, recognizable in that the characteristics mentioned in claim 2 are used as a function of the length of the dark phase for proof of damage.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1 page of drawings is attached

#### Application areas of the invention

The procedure according to the invention can be used advantageously for judging the effects of biological, chemical, and physical stress factors. Measures to avert an otherwise occurring injury can be initiated in a timely manner by using this procedure. The optical procedure according to the invention is suitable, for example, for proof of damage of the photosynthetic apparatus of green plants through

- Garden pests (virus infestation)
  - Agricultural chemicals
  - Frost
  - High energy radiation (for example UV, X-ray, Gamma rays)
  - Heat
  - Water and nutrient deficiency
  - Harmful gases such as CO, SO<sub>2</sub>, nitrous fumes.
- The procedure according to the invention can be used for
- timely initiation of pest control
  - proper dosage of agricultural chemicals (for example, herbicides).

#### Characteristics of current technological solutions

For judging the functionality of the photosynthesis apparatus, gas exchange measurements were used almost exclusively until now, whereby the CO<sub>2</sub> concentration is measured in a closed circulation system and the CO<sub>2</sub> usage is used as a measurement for the photosynthesis activity, or the acid production measured by means of a Clark electrode is used as a measurement for the photosynthetic activity. Both procedures require a closed circulation system with a controlled gas atmosphere. The plants or cut off plant parts must be placed in this for measurement. In modern procedures for judging the effects of herbicides, chloroplast preparations from green plants are produced in a complicated manner and placed in biochemical preparations with synthetic electron donors or electron acceptors, and the electron transport capacity of these preparations is then determined. / U. Metzger, Investigation of the photosynthetic electron transport of isolated chloroplasts. Problems of determination of the mechanism of action of potential herbicides, Dissertation B, Halle 1981/.

Procedures developed in recent years through hour long recording of the luminescence light to prove damage of plants require technical equipment and are very costly in research time.

/J. L. Ellenson, R. G. Armundson, Delayed light imaging for the early detection of plant stress, Science 215, 1104-1106(1982) and R. Blaich, O. Bachmann, I. Baumberger, Studies of photosynthesis inhibition by phytoluminography, Z. Naturf. 37c, 452-457(1982)/

#### Goal of the invention

The goal of the invention is the preparation of a sensitive proof method for damage to the photosynthesis apparatus with the elimination of the disadvantages mentioned above such as higher expenditure on equipment and low sensitivity.

#### Explanation of the nature of the invention

The task of the invention is the development of an optical procedure for the proof of damage of the photosynthesis apparatus with the use of delayed chlorophyll fluorescence. According to the invention the task is solved in that the induction curve of the delayed chlorophyll fluorescence is used as a proof of damage to the photosynthesis apparatus. It was found that damages could be proved based on the induction curves of the delayed chlorophyll fluorescence, among others, those which are provable through prompt fluorescence measurements.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

The proof of the damage succeeds through comparison of the induction curve of the delayed chlorophyll fluorescence of the plants to be investigated with a corresponding curve for undamaged plants or from a normal curve obtained through experience (these will be referred to as control curves). The procedure is as follows:

1. The induction curve of the delayed chlorophyll fluorescence is measured on the plant to be investigated (test curve), for example, using the procedures described in the work / R. Koepp, M. Senoner, K. Zacharczuk, F. Mir, Induction curves of the delayed fluorescence of maize leaves (*Zea mays*), Coll. Pflanzenphysiologie 5, 115-117(1982)/.
2. The test curve is compared with the control curve. For proof of definite damages, the comparison of the relationship of the maximal to stationary fluorescence intensity of the test curve with the normal curve is sufficient. Should damages be proved that are very weak, temporarily effective, or are slightly distinctive in the beginning stage, additional differences between the test curve and the control curve can be considered, for example differences

- in the time position of the maximum

- in the time shift of the maximum with altered dark time before turning on the light or

- in the height of the maximum with dependence on the dark time before turning on the light

The comparison of the test curve and the control curve can succeed automatically, for example, in automatic sorting devices, with plants in well characterized physiological states and for the selection of undamaged plants or plants damaged to a desired degree.

The advantage of this procedure according to the invention compared to the previous ones consists in that a sealed and controlled gas atmosphere is not necessary. It can be measured directly on the leaf in vivo. It is only necessary that the green plants or plant parts on which the procedure according to the invention be applied be in a controlled darkness.

The invented procedure possesses a high sensitivity. Thus, for example, an inhibition of the photosynthesis apparatus by DCMU through the procedure according to the invention can be proven at a concentrations that are orders of magnitude lower than can be recognized by other procedures. Also, the effect of UV and gamma radiation on plants can be determined even with small degrees of damage.

In summary, the procedure of the invention has the following advantages:

- a high sensitivity

- the low labor cost of measuring of a sample

- the possibility of measuring living plants without injuring them, and

- the possibility of using only one size to characterize the damage of plants, thereby ability to use the procedure according to the invention for an automatic selection of plants with the desired degree of damage.

The invention will be explained more closely in the following implementation example:

#### Implementation example

With a Becquerel-Phosphoroscope (a newer procedure is described by R. Koepp, F. Mir, M. Seoner, and K. Zacharczuk, Message to the Akad. D. Landwirtschaftswissenschaften, 1982) the induction curve of the delayed fluorescence for undamaged (1) and damaged plants is measured. As an example, Fig. 1 gives these curves for maize leaves which were damaged by ultraviolet radiation. The comparison of the curves for the damaged objects (2) with those for undamaged objects (1) can best succeed in the following manner:

- Gathering of values: maximal fluorescence  $L_{max}$  (maximum of curve(1) or (2) in Fig. 1) and stationary fluorescence  $L_{stat}$

- Construction of the relationship  $(L_{max}-L_{stat})/L_{stat} = v$ . The quotient  $V_1/V_2$  is a measure of the damage.

- The determination of  $V$  can be undertaken manually by the examination of a few objects. Should a large plant number be used, the damage measurement can also automatically be determined through digital measurement value processing.

3            248 433

L/rel. Units

Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 248 433 A1

4(51) G 01 N 21/64  
G 01 N 33/483

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	WP G 01 N / 269 567 2	(22)	16. 11. 84	(44)	05. 08. 87
------	-----------------------	------	------------	------	------------

---

(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, 1080 Berlin, Unter den Linden 6, DD
(72)	Koepp, Reinhold, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Senoner, Mathias, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Kutscher, Joachim, Dipl.-Phys.; Schönborn, Hans-Jürgen, Dr. rer. nat. Dipl.-Biophys.; Voigt, Joachim, Doz. Dr. sc. nat. Dipl.-Phys.; Matschke, Jürgen, Dr. sc. Dipl.-Landw.-Phys., DD

---

(54)	Optisches Verfahren zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates
------	--

---

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates und kann insbesondere zur Beurteilung der Einwirkung von biologischen, chemischen und physikalischen Streßfaktoren genutzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann in der Land- und Forstwirtschaft und im Gartenbau sowie im Umweltschutz angewendet werden. Aufgabe der Erfindung ist die Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates unter Ausnutzung der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Induktionskurve der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz zum Nachweis von Schädigungen am Photosyntheseapparat ausgenutzt wird. Dabei werden die Induktionskurven geschädigter Pflanzen mit denen ungeschädigter Pflanzen verglichen.

## Patentansprüche:

1. Optisches Verfahren zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates durch Messung der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Intensität der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz als Funktion der Zeit ab Beginn einer Belichtung nach einer Dunkelphase an einer zu untersuchenden Pflanze gemessen, und diese Kurve mit einer Kurve für ungeschädigte Pflanzen verglichen wird und die Abweichung als Maß für die Schädigung genommen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die folgenden Kurvenmerkmale zum Vergleich benutzt werden: Höhe des Maximums, Verhältnis der Höhe des Maximums zur Höhe des stationären Niveaus und zeitliche Lage des Maximums.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in Anspruch 2 genannten Merkmale als Funktion der Länge der Dunkelphase zum Nachweis der Schädigung genutzt werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

## Anwendungsgebiete der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft zur Beurteilung der Einwirkung von biologischen, chemischen und physikalischen Streßfaktoren genutzt werden. Maßnahmen zur Abwendung eines sonst eintretenden Schadens können bei Benutzung dieses Verfahrens rechtzeitig eingeleitet werden. Das erfindungsgemäße optische Verfahren ist beispielsweise zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates grüner Pflanzen durch

- Pflanzenschädlinge (Virusbefall)
  - Agrarchemikalien
  - Frost
  - energiereiche Strahlungen (z.B. UV-, Röntgen-,  $\gamma$ -Strahlung)
  - Hitze
  - Wasser- oder Nährstoffmangel
  - schädigende Gase wie CO, SO<sub>2</sub>, nitrose Gase
- geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann genutzt werden zur

- rechtzeitigen Einleitung der Schädlingsbekämpfung
- richtigen Dosierung von Agrochemikalien (z. B. von Herbiziden).

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit des Photosyntheseapparates wurden bisher fast ausschließlich Gaswechsellmessungen durchgeführt, wobei in einem abgeschlossenen Kreislauf die CO<sub>2</sub>-Konzentration gemessen und der CO<sub>2</sub>-Verbrauch als Maß für die Photosyntheseaktivität benutzt wird oder mittels Clarkelektrode die Sauerstoffproduktion als Maß für die Photosyntheseaktivität bestimmt wird. Beide Verfahren erfordern einen geschlossenen Kreislauf mit kontrollierter Gasatmosphäre. Die Pflanzen oder abgeschnittene Pflanzenteile müssen zur Messung in diesen eingebracht werden.

Bei modernen Verfahren zur Beurteilung der Wirkung von Herbiziden werden auf komplizierte Weise Chloroplastenpräparationen aus grünen Pflanzen hergestellt und in biochemische Ansätze mit künstlichen Elektronendonatoren oder Elektronenakzeptoren eingebracht, in denen dann die Elektronentransportkapazität bestimmt wird /U. Metzger, Untersuchung des photosynthetischen Elektronentransportes isolierter Chloroplasten. Probleme der Ermittlung des Wirkungsmechanismus potentieller Herbizide, Dissertation B, Halle 1981/.

In den letzten Jahren entwickelte Verfahren, durch stundenlanges Erfassen des Lumineszenzlichtes eine Schädigung von Pflanzen nachzuweisen /J. L. Ellenson, R. G. Amundson, Delayed light imaging for the early detection of plant stress, Science 215, 1104-1106 (1982) und R. Blaich, O. Bachmann, I. Baumberger, Studies of photosynthesis inhibition by phytoluminography, Z. Naturf. 37c, 452-457 (1982)/ sind apparativ und die Versuchszeit betreffend sehr aufwendig.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung einer empfindlichen Nachweismethode für Schädigungen des Photosyntheseapparates unter Ausschaltung vorgenannter Nachteile wie hoher apparativer Aufwand und geringe Nachweisempfindlichkeit.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Entwicklung eines optischen Verfahrens zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates unter Ausnutzung der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Induktionskurve der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz zum Nachweis von Schädigungen am Photosyntheseapparat ausgenutzt wird. Es wurde gefunden, daß anhand der Induktionskurven der verzögerten



Chlorophyllfluoreszenz Schädigungen nachgewiesen werden konnten, die um ein Vielfaches unter denen liegen, die durch prompte Fluoreszenzmessungen nachweisbar sind. Der Nachweis der Schädigung erfolgt durch Vergleich der Induktionskurve der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz der zu untersuchenden Pflanzen mit einer entsprechenden Kurve für ungeschädigte Pflanzen oder einer aus Erfahrung gewonnenen Normalkurve (im weiteren werden diese beiden Kurven als Kontrollkurve bezeichnet). Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

1. Es wird die Induktionskurve der verzögerten Chlorophyllfluoreszenz an der zu untersuchenden Pflanze (Probenkurve) gemessen, z. B. unter Benutzung der in der Arbeit /R. Koepp, M. Senoner, K. Zacharczuk, F. Mir, Induktionskurven der verzögerten Fluoreszenz von Maisblättern (Zea mays), Coll. Pflanzenphysiologie 5, 115-117 (1982)/ beschriebenen Anordnung.
2. Die Probenkurve wird mit der Kontrollkurve verglichen. Zum Nachweis deutlicher Schädigungen reicht der Vergleich des Verhältnisses von maximaler zu stationärer Fluoreszenzintensität der Probenkurve mit dem der Normalkurve aus. Sollen Schädigungen nachgewiesen werden, die sehr schwach, vorübergehend wirksam oder im Anfangsstadium wenig ausgeprägt sind, so können weitere Unterschiede zwischen Probenkurve und Kontrollkurve herangezogen werden, beispielsweise Unterschiede
  - in der zeitlichen Lage der Maxima,
  - in der zeitlichen Verschiebung des Maximums mit veränderter Dunkelzeit vor Einschalten des Lichtes oder
  - in der Höhe des Maximums in Abhängigkeit von der Dunkelzeit vor Einschalten des Lichtes.

Der Vergleich von Probenkurve und Kontrollkurve kann bei Pflanzen in gut charakterisiertem physiologischem Zustand automatisch erfolgen und zur Selektion von ungeschädigten oder in gewünschtem Grade geschädigten Pflanzen genutzt werden, z. B. in automatischen Sortieranlagen.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber den herkömmlichen besteht darin, daß eine abgeschlossene und kontrollierte Gasatmosphäre nicht erforderlich ist. Es kann unmittelbar am Blatt in vivo gemessen werden. Es ist lediglich notwendig, daß sich die grünen Pflanzen bzw. Pflanzenteile, an denen das erfindungsgemäße Verfahren angewendet wird, kontrolliert im Dunkel befinden.

Das erfinderische Verfahren besitzt eine hohe Nachweisempfindlichkeit. So kann z. B. eine Hemmung des Photosyntheseapparates durch DCMU durch das erfindungsgemäße Verfahren schon bei Konzentrationen nachgewiesen werden, die um Größenordnungen unter denen liegen, die mit anderen Verfahren erkannt werden. Auch die Einwirkung von UV- und  $\gamma$ -Strahlung auf Pflanzen kann durch das erfindungsgemäße Verfahren bereits bei geringerem Schädigungsgrad festgestellt werden.

Zusammenfassend hat das erfinderische Verfahren folgende Vorteile:

- eine hohe Nachweisempfindlichkeit;
- der geringe Arbeitszeitaufwand zur Messung einer Probe;
- die Möglichkeit, an der lebenden Pflanze zu messen ohne diese zu verletzen und
- die Möglichkeit, mit nur einer Größe die Schädigung von Pflanzen zu charakterisieren und damit das erfindungsgemäße Verfahren zu einer automatischen Selektion von Pflanzen mit dem gewünschten Schädigungsgrad zu nutzen.

Die Erfindung soll anhand des nachstehenden Ausführungsbeispiels näher erläutert werden:

#### Ausführungsbeispiel

Mit einem Becquerel-Phosphoroskop (eine neuere Ausführung wird von R. Koepp, F. Mir, M. Senoner und K. Zacharczuk, Mitteilungen der Akad. d. Landwirtschaftswissenschaften, 1982, beschrieben) wird die Induktionskurve der verzögerten Fluoreszenz für ungeschädigte (1) und geschädigte Pflanzen gemessen.

Als Beispiel gibt Fig. 1 diese Kurven für Maisblätter, die durch ultraviolette Strahlung geschädigt wurden, an. Der Vergleich der Kurven für die geschädigten Objekte (2) mit denjenigen für ungeschädigte (1) kann vorteilhaft auf folgende Art und Weise erfolgen:

- Entnahme der Werte: maximale Fluoreszenz  $L_{\max}$  (Maximum der Kurve (1) bzw. (2) in Fig. 1) und stationäre Fluoreszenz  $L_{\text{stat}}$ .
- Bildung des Verhältnisses  $(L_{\max} - L_{\text{stat}}) / L_{\text{stat}} = V$ . Der Quotient  $V_1 / V_2$  ist ein Maß für die Schädigung.
- Die Bestimmung von  $V$  kann bei Prüfung weniger Objekte manuell vorgenommen werden. Soll eine große Pflanzenanzahl erfaßt werden, kann das Schädigungsmaß durch digitale Meßwertverarbeitung auch automatisch bestimmt werden.

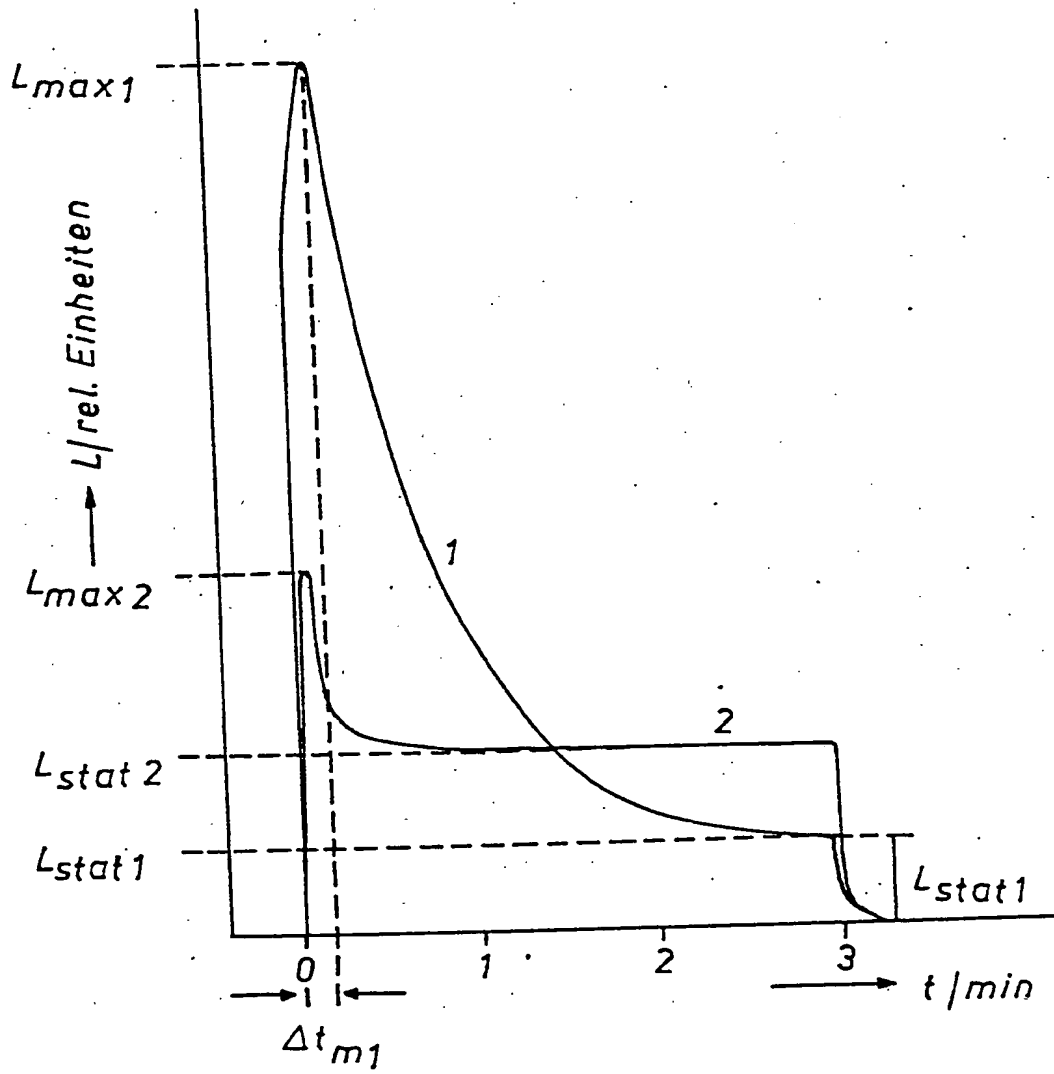


Fig. 1